

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN 12 MẪU GIỐNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO THU THẬP Ở VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Nông Thị Huệ¹, Trần Thị Thảo¹, Lê Phương Linh¹,
Ninh Thị Thảo¹, Ngô Xuân Nghiễn^{1,2}, Đinh Trường Sơn^{1,3*}

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Nấm ăn, Nấm dược liệu, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: dtson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

TÓM TẮT

Đông trùng hạ thảo là loài nấm dược liệu quý và có giá trị cao thuộc chi *Cordyceps*. Tuy nhiên, người tiêu dùng hầu như không biết được nguồn gốc, chủng loại các mẫu giống đang lưu hành trên thị trường. Nghiên cứu này nhằm định danh 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo thu thập được bằng giải trình tự ITS và đánh giá đa dạng di truyền 12 mẫu giống bằng chỉ thị RAPD và ISSR. Kết quả cho thấy 12 mẫu giống thu thập được đều thuộc loài *Cordyceps militaris*. Mười lăm mồi RAPD và 15 mồi ISSR phát hiện được tổng số 340 locus trong đó 291 locus đa hình và nhân bản được 2092 băng DNA. Hệ số tương đồng di truyền của 12 mẫu giống khi phân tích bởi hai chỉ thị RAPD và ISSR dao động từ 0,568-0,841, cho thấy các mẫu giống có mức độ đa dạng di truyền cao. Tại hệ số tương đồng di truyền 0,70; 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo chia thành 3 nhóm di truyền chính. Kết quả kiểm định Mantel chỉ ra sự tương quan cao giữa các ma trận hệ số tương đồng di truyền phân tích bởi RAPD, ISSR riêng lẻ hay kết hợp. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin hữu ích cho công tác định hướng khai thác và phát triển nguồn gen đông trùng hạ thảo.

Từ khóa: *Cordyceps*, đông trùng hạ thảo, đa dạng di truyền, ISSR, RAPD.

RAPD and ISSR Markers Assessment of Genetic Diversity of 12 *Cordyceps* Accessions collected in Vietnam

ABSTRACT

Cordyceps spp. belong to the most valuable medicinal caterpillar fungi. However, consumers hardly know the origin and species of *Cordyceps* spp. commercialized on the market. This study aimed to identify 12 collected *Cordyceps* samples collected at various locations in Vietnam by ITS sequencing and evaluate the genetic diversity these samples using RAPD and ISSR markers. 12 *Cordyceps* accessions were identified as *Cordyceps militaris* using ITS sequencing. 15 RAPD markers and 15 ISSR markers successfully detected 340 loci of which 291 were polymorphic and a total of 2092 scorable bands were obtained. The similarity coefficient of 12 *Cordyceps* spp. accessions ranged from 0.568 to 0.841 when combined RAPD and ISSR markers, indicating high genetic diversity. At a genetic similarity of 0.7, the UPGMA dendrogram constructed based on RAPD and ISSR makers separated 12 *Cordyceps* accessions into three distinct clusters. The correlation analysis between the matrices of similarity coefficients using Mantel's test revealed a strong correlation among matrices analyzed by RAPD, ISSR or pooled data. Our results could provide useful information for the exploitation and breeding of *Cordyceps militaris* accessions.

Keywords: *Cordyceps*, *Cordyceps militaris*, genetic diversity, ISSR, RAPD.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps* spp.) thuộc chi *Cordyceps* là loài nấm dược liệu quý và được sử dụng trong y học từ lâu đời (Jędrejko & cs.,

2021). Các phân tích hóa học cho thấy đông trùng hạ thảo (ĐTHT) có chứa nhiều hoạt chất quý như cordycepin, nhiều loại amino acid không thay thế, các chất vi lượng và các loại vitamin (Holliday & cs., 2004). Nghiên cứu chuyên sâu về

tác dụng được lý cho các hoạt chất cho thấy cordycepin được dùng trong điều trị những bệnh rối loạn miễn dịch và hỗ trợ điều trị ung thư (Holliday & cs., 2004).

Chi *Cordyceps* ghi nhận có khoảng 680 loài phân bố khắp nơi trên thế giới, đặc biệt ở những vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Đông Á và Đông Nam Á (Holliday & Cleaver, 2008). *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) và *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) là hai loài được chú trọng nghiên cứu nhiều nhất do chứa nhiều hợp chất được liệu quý (Holliday & cs., 2004; Li & cs., 2006). Loài *C. militaris* dễ dàng nuôi cấy nhân tạo và chứa hàm lượng hoạt chất cordycepin cao trong sợi nấm và quả thể (Jędrejko & cs., 2021). Trong khi đó việc nuôi cấy chủ động loài nấm *C. sinensis* vẫn chưa thực sự thành công như mong đợi (Li & cs., 2006). Ngoài tự nhiên, ĐTHT đang bị khai thác quá mức trở nên khan hiếm, giá cả vô cùng đắt đỏ. Do đó, việc sử dụng các sản phẩm nấm ĐTHT nuôi cấy nhân tạo là sự lựa chọn phù hợp đảm bảo được nhu cầu tiêu dùng. Các loài nấm ĐTHT khác nhau có thể dẫn tới sự khác biệt về hàm lượng hoạt chất có hoạt tính sinh học (Wu & cs., 2016). Chính vì vậy, việc xác định chính xác loài cũng như đánh giá được mối quan hệ di truyền nguồn gen của nấm ĐTHT tại Việt Nam là cần thiết, góp phần định hướng cho công tác bảo tồn, quản lý, khai thác và phát triển loài được liệu quý này một cách phù hợp.

Nấm ĐTHT được phân biệt chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái, giải phẫu, sự phát triển của hệ sợi và quả thể (Sung & cs., 2007; Tran & cs., 2023). Tuy nhiên, phương pháp này gặp nhiều trở ngại vì hình thái của chúng thay đổi theo điều kiện môi trường và hình thức sinh sản: sinh sản hữu tính (trạng thái quả thể) và sinh sản vô tính (trạng thái sợi nấm) (Tran & cs., 2023). Do đó, việc sử dụng chỉ thị phân tử là cần thiết để xác định loài cũng như đánh giá được mối quan hệ di truyền của nguồn gen ĐTHT (Chen & cs., 1999; 2004; Liang & cs., 2005; Zhang & cs., 2009; Tran & cs., 2023). So với các chỉ thị hình thái, các chỉ thị phân tử như RAPD (random-amplified polymorphic DNA), ISSRs (inter-simple sequence repeats) có những ưu điểm nổi bật như ổn định, dễ thực hiện, không phụ thuộc vào các yếu tố ngoại cảnh, có mức đa

hình cao và rất hiệu quả trong đánh giá quan hệ di truyền trên nhiều đối tượng khác nhau (Chen & cs., 1999, 2004; Liang & cs., 2005).

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về định danh loài hay đánh giá đa dạng nguồn gen loài nấm *C. sinensis* (Tran & cs., 2023). Tại Việt Nam, các nghiên cứu về đa dạng di truyền loài nấm ĐTHT còn rất hạn chế. Các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào phân tích về thành phần loài, đặc điểm hình thái, sinh thái và công nghệ nuôi trồng nấm (Trịnh Tam Kiệt, & Trịnh Tam Bảo, 2008; Trần Thanh Thy & Lê Văn Vàng, 2020; Tran & cs., 2023). Trong nghiên cứu này, 12 mẫu giống ĐTHT thu thập ở các địa điểm khác nhau được định danh bằng giải trình tự vùng ITS và đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen bởi chỉ thị RAPD và ISSR. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp thông tin phục vụ công tác bảo tồn, quản lý và khai thác nguồn gen.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười hai mẫu giống đông trùng hạ thảo thu thập ở các địa điểm khác nhau được liệt kê trên bảng 1. Đây là các mẫu giống được bán trên thị trường với các tên thương mại khác nhau.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA

DNA tổng số của 12 mẫu giống ĐTHT được tách chiết bằng bộ kit BioFACT™ Genomic DNA Prep Kit for Fungus (BIOFACT, Hàn Quốc). Độ nguyên vẹn của mẫu DNA được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu được kiểm tra trên máy đo quang phổ.

2.2.2. Xác định loài nấm đông trùng hạ thảo bằng phân tích trình tự ITS

Vùng gen ITS được khuếch đại bằng cặp mồi ITS5-F (5'-AGGAGAAGTCGTAACAAG-3') và ITS4-R (5'-GTTTCCTTTCCCTCCGCT-3') (Lam & cs., 2015). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**Bảng 1. Danh sách
12 mẫu giống Đông trùng hạ thảo và địa điểm thu thập**

STT	Địa điểm thu thập mẫu	Kí hiệu mẫu
1	Gia Lâm - Hà Nội	Co-TTN
2	Gia Lâm - Hà Nội	Co-TTT
3	Gia Lâm - Hà Nội	Co-CNTP
4	Long Biên - Hà Nội	Co-LB
5	Thanh Trì - Hà Nội	Co-TT
6	Thái Nguyên	Co-TN
7	Lai Châu	Co-LC
8	Hưng Yên	Co-HY
9	Hai Bà Trưng - Hà Nội	Co-HBT
10	Chương Mỹ - Hà Nội	Co-CM
11	Cầu Giấy - Hà Nội	Co-HQV
12	Thanh Khê - Đà Nẵng	Co-DN

2.2.3. Phản ứng PCR

Thông tin về trình tự và nhiệt độ gắn môi của 15 chỉ thị RAPD (Operon Technologies Inc., Alameda, California, USA) và 15 chỉ thị ISSR (Đại học British Columbia, Canada) được trình bày ở trên bảng 3 và 4.

Phản ứng PCR sử dụng bộ kit 2X PCR Master mix Solution (*i*-Taq) (iNtRON Bio, Hàn Quốc). Thể tích phản ứng 20 μ l gồm 10 μ l đệm *i*-Taq Mix, 1 μ l mỗi (10 μ M), 2 μ l DNA khuôn (3 ng/ μ l) và 7 μ l nước cất hai lần. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện trên máy ASTEC Thermal Cyclers (Gene Atlas, ASTEC, Japan) 1 chu kỳ 95°C, 5 phút - 40 chu kỳ gồm (95°C, 30 giây \rightarrow nhiệt độ gắn môi phù hợp cho từng môi, 30 giây \rightarrow 72°C, 1 phút) và 1 chu kỳ cuối 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1%. Hiện hình sản phẩm và chụp ảnh bằng hệ thống máy chụp UVP Biodoc-it.

2.2.4. Phân tích đa dạng di truyền

Ma trận nhị phân được xây dựng theo nguyên tắc các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Sử dụng hệ số tương đồng của Sokal và Michener (1958) và phương pháp gom cụm UPGMA trong

phần mềm NTSYSpc 2.1 để xác định mối quan hệ di truyền của các mẫu giống ĐHTH.

Hệ số PIC được xác định bằng công thức: $PIC = 1 - p^2 - q^2$ (Botstein & cs., 1980). Trong đó: p, q lần lượt là tần số của các cá thể mang locus và không mang locus.

Chỉ số sai khác của mỗi cặp môi R_p (resolving power): $R_p = \sum I_b$. Trong đó: I_b là giá trị đại diện cho thông tin của đoạn, được tính theo công thức $I_b = 1 - [2 \times |0,5 - p|]$, với p là tần số xuất hiện băng của locus (Prevost & Wilkinson, 1999).

Phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis - PCA) và xác định tương quan giữa các ma trận hệ số tương đồng di truyền bằng kiểm định Mantel trong phần mềm XLSTAT 2.2.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định loài cho các mẫu giống đông trùng hạ thảo bằng trình tự ITS

Vùng ITS với kích thước khoảng 550bp của 12 mẫu giống ĐHTH được nhân bản và giải trình tự với cặp môi ITS4R/ITS5F. Phân tích dữ liệu giải trình tự ITS cho thấy kích thước các đoạn dao động từ 495-552 nucleotide. Dựa vào kết quả

so sánh và tìm kiếm các trình tự ITS tương đồng trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy tất cả 12 mẫu giống đều thuộc loài *Cordyceps militaris* (Bảng 2) và có mức độ tương đồng cao đạt 100% với các loài với mã tham chiếu KM197165.1 *Cordyceps militaris* isolate WU-CMH; JX488481.1 *Cordyceps militaris* strain 1812; KR673509.1 *Cordyceps militaris* voucher KA12-1262; MN622777.1 *Cordyceps militaris* JFRL20 và MK131341.1 *Cordyceps militaris* voucher Fbozok00139.

Kết quả nghiên cứu này không gây bất ngờ vì cho đến nay *C. militaris* được biết là loài dễ dàng hình thành quả thể khi nuôi cấy nhân tạo (Jędrejko & cs., 2021). Kết quả nghiên cứu cũng khá tương đồng với báo cáo của Wang & cs. (2008) khi các tác giả kết luận các mẫu thu ở các địa điểm khác nhau đều có mức tương đồng rất cao với loài *C. militaris* (trên 98%) và sự đa dạng di truyền dựa trên trình tự ITS là rất nhỏ và không tương quan với nguồn gốc địa lý của chúng.

3.2. Phân tích đa hình các locus ở 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo với chỉ thị RAPD và ISSR

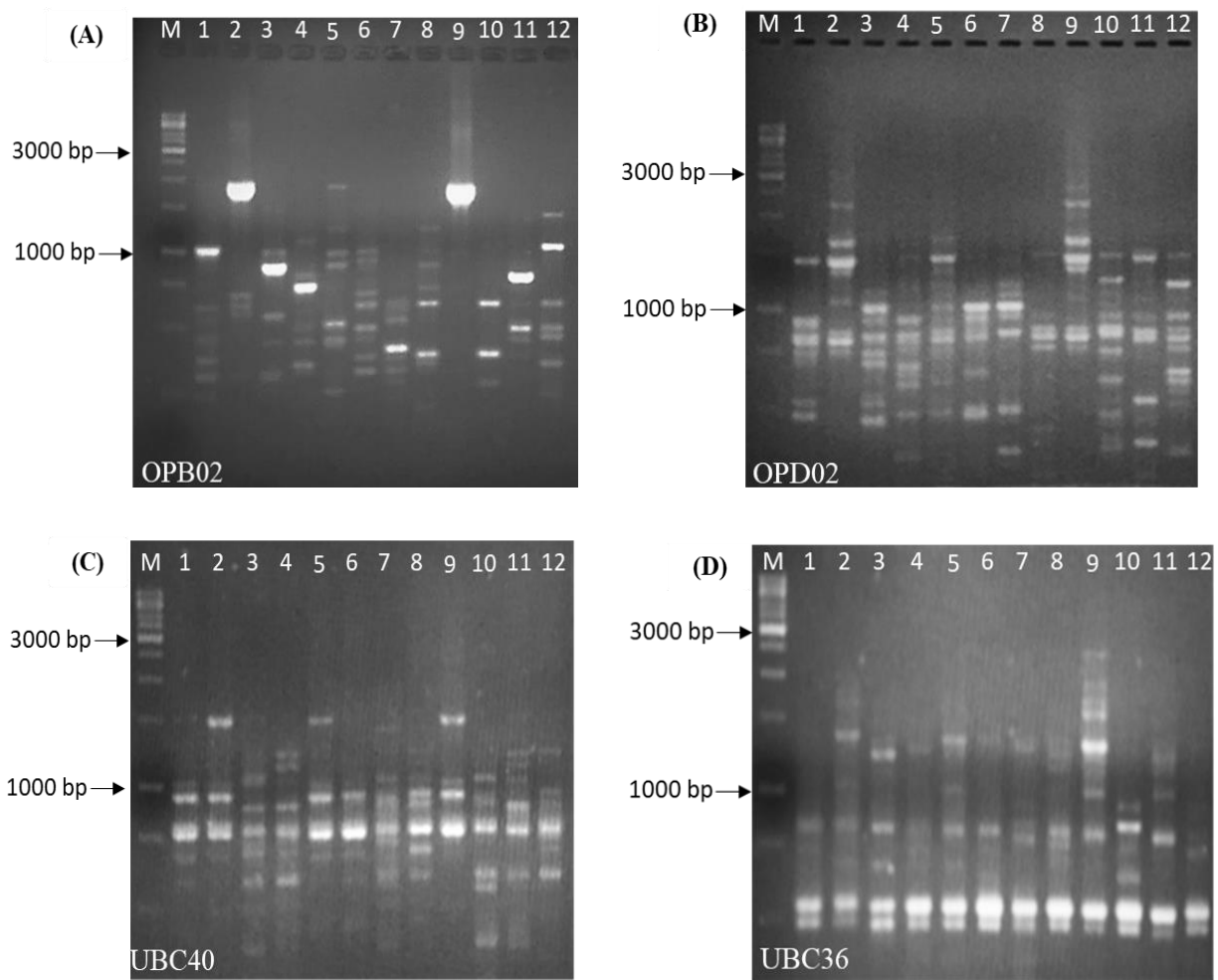
Chỉ thị RAPD và ISSR được chứng minh có hiệu quả trong việc phân tích đa dạng di truyền của nhiều loài thuộc chi *Cordyceps* (Zhang & cs., 2009). Tổng số 1.118 và 974 băng DNA đã được

nhân bản từ 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo khi sử dụng 15 mỗi RAPD và 15 mỗi ISSR (Bảng 3 và 4, Hình 1). Đối với chỉ thị RAPD, số băng nhân bản được dao động từ 43-123 băng/mẫu (trung bình 74,53 băng/mẫu), trong khi đó, chỉ số này đối với chỉ thị ISSR là 36-128 băng/mẫu (trung bình 64,93 băng/mẫu). Cụ thể, với chỉ thị RAPD, mỗi OPA02 nhân bản được số băng lớn nhất (123 băng), trong khi đó hai mẫu OPC01 và AP-G05 nhân bản được số băng ít nhất với 43 băng (Bảng 3). Đối với ISSR, số băng thấp nhất và cao nhất được quan sát ở các mẫu UBC807 (36 băng) và UBC808 (128 băng) (Bảng 4).

150 trong tổng số 179 locus nhân bản được bởi 15 mỗi RAPD là đa hình (chiếm 80,63%), số lượng locus đa hình/mẫu trung bình là 10,60. Các chỉ thị cho số locus đa hình cao nhất là OPB02 và OPD02 (19 băng), tiếp đó hai chỉ thị OPC04 và AP-D18 cũng nhân bản được số locus đa hình khá cao tương ứng 17 và 16 locus đa hình. Nhóm chỉ thị cho số locus đa hình thấp nhất là chỉ thị OPC01 (3 locus), chỉ thị OPA03, AP-H 18 và AP-I 07 (5 locus) (Bảng 3). Nhóm chỉ thị ISSR cũng ghi nhận kết quả tương tự khi phân tích đa hình 12 mẫu giống ĐTHT với tỷ lệ locus đa hình đạt 80,86% (132 locus đa hình trong tổng số 161 locus được nhân bản). Số lượng locus đa hình/mẫu trung bình đạt 8,80 (Bảng 4, Hình 1). Kết quả này cho thấy sự đa dạng di truyền cao của các mẫu giống ĐTHT phân tích.

Bảng 2. Kích thước vùng ITS được giải trình tự của 12 mẫu ĐTHT

Kí hiệu mẫu	Kích thước vùng ITS được giải trình tự (bp)	Mức độ tương đồng với loài tham chiếu (%)	Loài xác định
Co-TTN	552	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-TTT	540	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-CNTP	495	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-LB	550	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-TT	544	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-TN	540	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-LC	550	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-HY	550	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-HBT	551	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-CM	540	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-HQV	540	100	<i>Cordyceps militaris</i>
Co-DN	550	100	<i>Cordyceps militaris</i>



Ghi chú: M: DNA ladder 1 Kb; 1-12: 12 mẫu giống ĐTHT.

Hình 1. Đa hình các locus phân tích bởi chỉ thị RAPD (A, B) và ISSR (C, D)

Chen & cs. (1999) đánh giá mối quan hệ di truyền của 29 mẫu *C. sinensis* sử dụng 18 chỉ thị RAPD cho tỷ lệ locus đa hình đạt 73%, trong khi tỷ lệ này đạt 87% khi Singh & cs. (2009) sử dụng 20 chỉ thị RAPD để đánh giá đa dạng di truyền các mẫu *C. sinensis* thu thập tại Himalaya, Ấn Độ. Đặc biệt, Liang & cs. (2008) khi phân tích đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể loài *C. sinensis* ở các địa điểm khác nhau tại Trung Quốc với 9 chỉ thị ISSR đã ghi nhận tỷ lệ băng đa hình lên đến 99,3% (Liang & cs., 2008).

Giá trị PIC thường được sử dụng để đo khả năng phát hiện đa hình của môi. Đối với các chỉ thị trội như RAPD, ISSR giá trị PIC nằm trong

khoảng 0-0,5 (Serrote & cs., 2020). Khi phân tích đa hình bởi RAPD, giá trị PIC thấp nhất và cao nhất được phát hiện ở môi OPA04 (0,16) và hai môi OPD02 và AP-G 05 (0,34), giá trị PIC trung bình đạt 0,25 (Bảng 3). Tương tự, giá trị PIC trung bình đạt 0,26 đối với nhóm chỉ thị ISSR. Môi UBC809 là chỉ thị cho giá trị PIC thấp nhất (0,13) và UBC823 cho giá trị PIC cao nhất (0,36) (Bảng 4). Theo Botstein & cs. (1980), các chỉ thị có hệ số PIC nằm trong khoảng 0,25-0,5 sẽ cung cấp những thông tin có giá trị trong nghiên cứu đa dạng di truyền. Như vậy, kết quả hiện tại cho thấy khả năng phân tích đa hình của chỉ thị RAPD và ISSR đối với 12 mẫu giống ĐTHT ở mức độ trung bình.

Đánh giá đa dạng di truyền 12 mẫu giống đồng trùng hạ thảo thu thập ở Việt Nam bằng chỉ thị RATPD và ISSR

Bảng 3. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi RAPD trên 12 mẫu Đồng trùng hạ thảo

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' -> 3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Số locus phát hiện được	Số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu giống	Chỉ số đa hình PIC của mỗi locus	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
1	OPA01	CAGGCCCTTC	32	9	8	88,89	90	7,50	0,26	3,00
2	OPA02	TGCCGAGCTG	32	13	8	61,54	123	10,25	0,23	4,17
3	OPA03	AGTCAGCCAC	30	8	5	62,50	81	6,75	0,17	1,83
4	OPA04	AATCGGGCTG	30	13	7	53,85	112	9,33	0,16	3,00
5	OPA05	AGGGGTCTTG	30	12	8	66,67	109	9,08	0,20	3,83
6	OPB02	TGATCCCTGG	30	19	19	100,00	54	4,50	0,32	8,67
7	OPB04	GGA CTGGAGT	30	11	10	90,91	74	6,17	0,31	5,00
8	OPC04	CCGCATCTAC	30	17	17	100,00	58	4,83	0,31	7,67
9	OPD02	GGACCAACC	32	19	19	100,00	76	6,33	0,34	9,00
10	OPC01	TTCGAGCCAG	30	4	3	75,00	43	3,58	0,18	0,83
11	AP-A 20	GTTGCGATCC	32	11	10	90,91	51	4,25	0,28	4,50
12	AP-D 18	GAGAGCCAAC	32	17	16	94,12	93	7,75	0,33	8,17
13	AP-G 05	CTGAGACGGA	32	10	10	100,00	43	3,58	0,34	4,83
14	AP-H 18	GAATCGGCCA	32	8	5	62,50	59	4,92	0,21	2,50
15	AP-I 07	CAGCGACAAG	32	8	5	62,50	52	4,33	0,17	1,67
Tổng số				179	150		1.118			
Trung bình/môi				11,93	10,60	80,63	74,53	6,21	0,25	4,58
Trung bình/mẫu giống				14,92	13,25		93,17			

Bảng 4. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi ISSR trên 12 mẫu Đông trùng hạ thảo

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' -> 3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Số locus phát hiện được	Số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/ mẫu giống	Chỉ số đa hình PIC của mỗi locus	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
1	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	49,0	6	5	83,33	36	3,00	0,25	2,33
2	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50,0	14	6	42,86	128	10,67	0,17	3,67
3	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	47,9	7	5	71,43	60	5,00	0,13	1,00
4	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	45,9	12	8	66,67	68	5,67	0,2	3,33
5	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50,0	10	8	80,00	79	6,58	0,25	3,17
6	UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	50,0	13	13	100,00	46	3,83	0,36	7,00
7	UBC826	ACACACACACACACACC	47,9	8	6	75,00	64	5,33	0,28	3,33
8	UBC827	ACACACACACACACACG	56,0	13	13	100,00	39	3,25	0,31	5,50
9	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	49,9	13	12	92,31	80	6,67	0,32	6,33
10	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51,9	14	12	85,71	57	4,75	0,24	4,50
11	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	47,9	14	13	92,86	57	4,75	0,33	6,83
12	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	53,9	10	9	90,00	61	5,08	0,33	5,50
13	UBC873	GACAGACAGACAGACA	45,0	11	10	90,91	62	5,17	0,31	5,00
14	UBC888	BDBCACACACACACACA	42,9	5	3	60,00	53	4,42	0,19	1,17
15	UBC889	DBDACACACACACACAC	42,9	11	9	81,82	84	7	0,29	5,00
	Tổng số			161	132		974			
	Trung bình/môi			10,73	8,80	80,86	64,93	5,41	0,26	4,24
	Trung bình/mẫu giống			13,42	11,00		81,17			

Ghi chú: Một số môi thoái hoá (degenerate primer) có sử dụng các nucleotide được viết dưới các ký hiệu khác biệt, trong đó: R có thể là nucleotide A/G, Y có thể là nucleotide C/T, B có thể là nucleotide C/G/T (không phải A), D có thể là nucleotide A/G/T (không phải C), H có thể là nucleotide A/C/T (không phải G) và V có thể là nucleotide A/C/G (không phải T).

Đánh giá đa dạng di truyền 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo thu thập ở Việt Nam bằng chỉ thị RATPD và ISSR

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền của 12 mẫu giống Đông trùng hạ thảo bằng chỉ thị RAPD (phía dưới đường chéo) và ISSR (phía trên đường chéo)

STT	ISSR												
	RAPD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Co-TTN	--	0,783	0,634	0,696	0,814	0,863	0,758	0,820	0,733	0,627	0,671	0,758
2	Co-TTT	0,754	--	0,602	0,702	0,845	0,758	0,665	0,727	0,789	0,609	0,665	0,689
3	Co-HQV	0,670	0,670	--	0,739	0,671	0,658	0,652	0,665	0,578	0,696	0,640	0,665
4	Co-LB	0,709	0,620	0,715	--	0,745	0,720	0,702	0,702	0,602	0,683	0,764	0,727
5	Co-TT	0,765	0,777	0,670	0,665	--	0,776	0,683	0,745	0,795	0,602	0,720	0,683
6	Co-TN	0,821	0,732	0,704	0,721	0,799	--	0,770	0,820	0,696	0,652	0,720	0,783
7	Co-LC	0,654	0,609	0,760	0,732	0,609	0,687	--	0,714	0,615	0,646	0,677	0,727
8	Co-HY	0,782	0,737	0,687	0,760	0,749	0,804	0,726	--	0,739	0,671	0,727	0,814
9	Co-HBT	0,737	0,883	0,620	0,603	0,760	0,693	0,581	0,721	--	0,559	0,615	0,627
10	Co-CM	0,670	0,592	0,665	0,715	0,603	0,648	0,704	0,709	0,575	--	0,720	0,646
11	Co-CNTP	0,709	0,676	0,737	0,698	0,687	0,709	0,721	0,737	0,648	0,760	--	0,689
12	Co-DN	0,721	0,721	0,737	0,732	0,721	0,754	0,765	0,760	0,659	0,693	0,732	--

Bảng 6. Hệ số tương đồng di truyền của 12 mẫu giống Đông trùng hạ thảo được phân tích bởi hai chỉ thị RAPD và ISSR

STT	RAPD + ISSR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Co-TTN	--											
2	Co-TTT	0,768	--										
3	Co-HQV	0,653	0,638	--									
4	Co-LB	0,703	0,659	0,726	--								
5	Co-TT	0,788	0,809	0,671	0,703	--							
6	Co-TN	0,841	0,744	0,682	0,721	0,788	--						
7	Co-LC	0,703	0,635	0,709	0,718	0,644	0,726	--					
8	Co-HY	0,800	0,732	0,676	0,732	0,747	0,812	0,721	--				
9	Co-HBT	0,735	0,838	0,600	0,603	0,776	0,694	0,597	0,729	--			
10	Co-CM	0,650	0,600	0,679	0,700	0,603	0,650	0,676	0,691	0,568	--		
11	Co-CNTP	0,691	0,671	0,691	0,729	0,703	0,715	0,700	0,732	0,632	0,741	--	
12	Co-DN	0,738	0,706	0,703	0,729	0,703	0,768	0,747	0,785	0,644	0,671	0,712	--

Chỉ số sai khác giữa các cặp mỗi Rp là thông số được sử dụng để chỉ ra tiềm năng phân biệt các cá thể của mỗi môi, chỉ số Rp cao cho thấy chỉ thị đó hiệu quả trong việc phân nhóm kiểu gen (Prevost & Wilkinson, 1999). Chỉ số Rp trung bình của 15 môi RAPD là 4,58 (dao động từ 0,83-9,00) (Bảng 3) trong khi giá trị này đạt 4,24 với nhóm 15 môi ISSR (dao động từ 1,00-7,00) (Bảng 4). Căn cứ vào các thông số phân tích đa hình của các locus cho thấy môi OPD02, OPB02 (RAPD) và UBC823, UBC 840 (ISSR) là những môi hiệu quả nhất trong việc phân tích đa hình các locus ở 12 mẫu ĐTHT và RAPD hiệu quả hơn ISSR trong việc phân tích đa dạng di truyền các mẫu giống này (Bảng 3 và 4). Trên thực tế, năng lực phân tích đa hình của RAPD và ISSR còn nhiều tranh cãi (Li & cs., 2017). Nhiều báo cáo chỉ ra ISSR hiệu quả hơn RAPD trong việc phát hiện đa hình trên nhiều đối tượng (Li & cs., 2022). Ngược lại, kết quả của nghiên cứu này có cùng nhận định là chỉ thị RAPD chiếm ưu thế hơn so với ISSR trong việc phát hiện đa hình (Patel & cs., 2016).

3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu giống

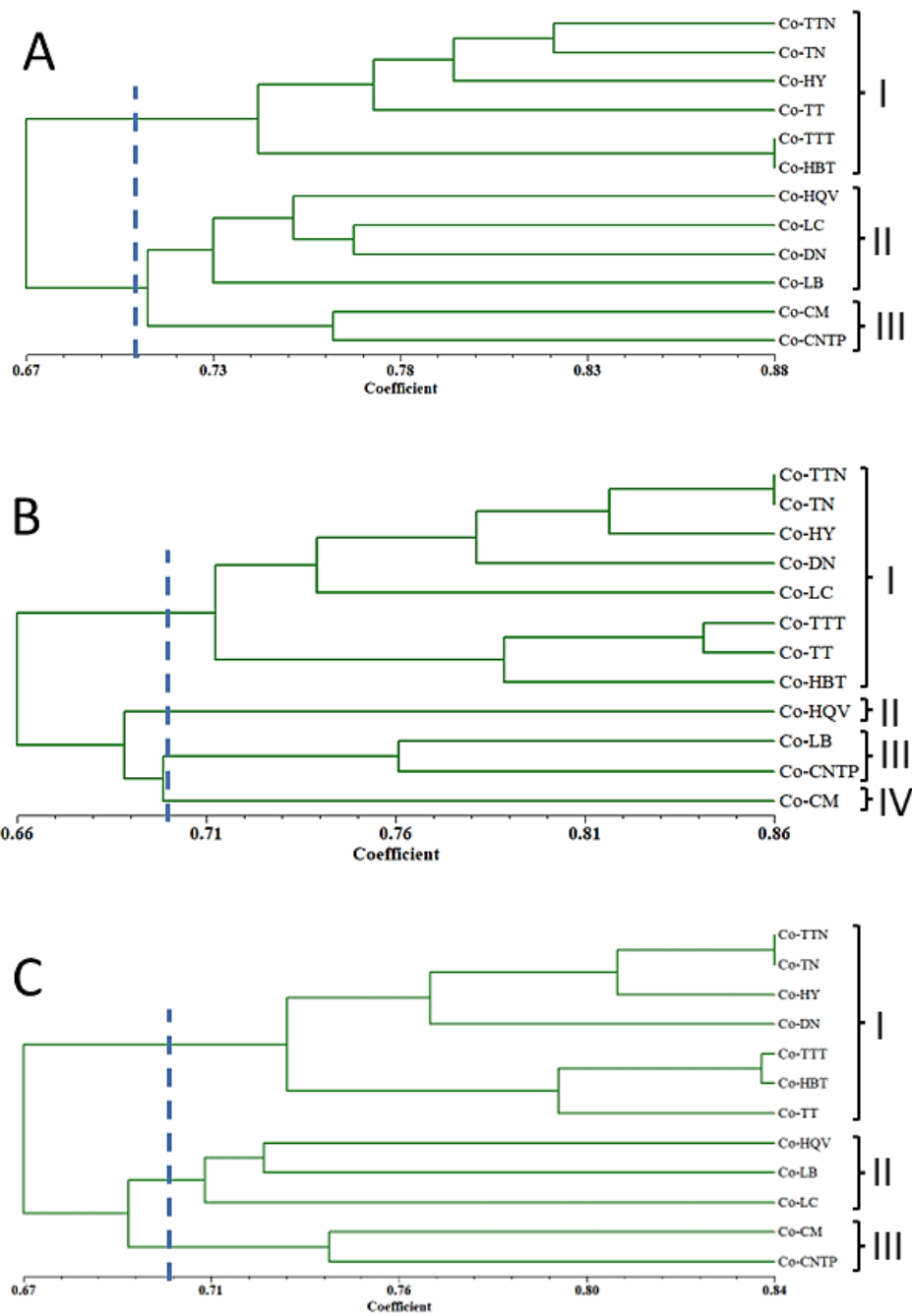
Khi phân tích bởi RAPD, hệ số tương đồng di truyền giữa 12 mẫu dao động trong khoảng 0,575-0,883 trong khi đối với chỉ thị ISSR hệ số này dao động từ 0,559-0,863 (Bảng 5), khi kết hợp hai chỉ thị RAPD và ISSR, hệ số tương đồng di truyền ghi nhận được từ 0,568-0,841 (Bảng 6).

Kết quả trên cho thấy 12 mẫu giống ĐTHT thu thập có sự đa dạng cao về mặt di truyền. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi phân tích sự đa dạng di truyền của loài nấm *C. sisnesis* thu được ở các địa điểm khác nhau ở Trung Quốc sử dụng chỉ thị phân tử RAPD (Chen & cs., 1999) và ITS (Chen & cs., 2004). Ngược lại, Sung & cs. (1999) khi phân tích mối quan hệ di truyền của 72 mẫu giống *C. militaris* thu ở 11 địa điểm khác nhau tại Hàn Quốc bằng chỉ thị RAPD đã chỉ ra không có mối tương quan

giữa sự đa dạng di truyền và nguồn gốc địa lý thu thập các mẫu.

Từ bảng hệ số tương đồng di truyền, sơ đồ mối quan hệ di truyền của 12 mẫu giống được xây dựng bằng phương pháp UPGMA. Kết quả phân nhóm dựa trên chỉ thị RAPD cho thấy: ở mức tương đồng di truyền trung bình 0,71 (71%) 12 mẫu giống ĐTHT được phân thành 3 nhóm di truyền chính. Nhìn trên sơ đồ có thể thấy mẫu Co-LB có khoảng cách di truyền xa nhất so với các mẫu còn lại, trong khi đó mẫu Co-TTT và Co-HBT nằm trên cùng một nhánh, thể hiện mối quan hệ di truyền gần nhất.

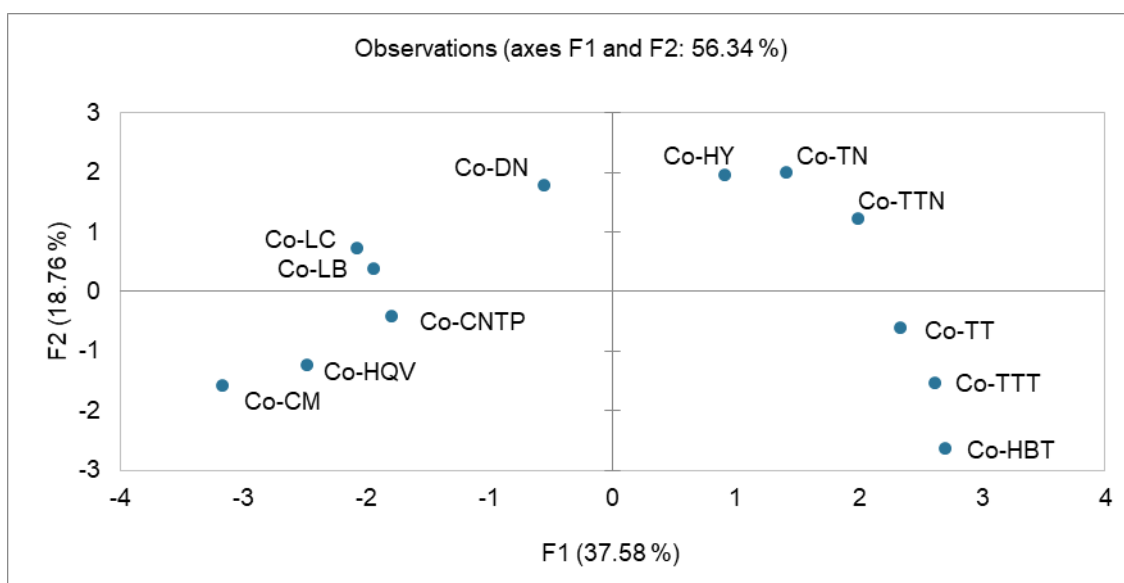
Khi phân tích bằng chỉ thị ISSR, 12 mẫu giống đồng trùng hạ thảo được chia thành 4 nhóm tại vị trí tương đồng di truyền trung bình (Hình 2B). Về cơ bản, sơ đồ cho thấy mẫu Co-HQV và Co-CM có khoảng cách di truyền xa nhất trong khi đó Co-TTN và Co-TN thể hiện mối quan hệ di truyền gần nhất. Khi kết hợp chỉ thị RAPD và ISSR, sự phân nhóm di truyền của các cặp mẫu giống (Co-TTT và Co-HBT) và (Co-CM và Co-CNTP) khá tương đồng khi so sánh với mô hình phân tích bởi RAPD (Hình 2A, C). Sự phân nhóm tương tự cũng quan sát được ở cặp mẫu giống (Co-TTN và Co-TN) khi phân tích bởi chỉ thị ISSR và kết hợp RAPD + ISSR (Hình 2B, C). Như vậy, khi phân tích bởi các chỉ thị RAPD hoặc ISSR riêng rẽ hay kết hợp hai chỉ thị RAPD + ISSR thì kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của 12 mẫu giống ĐTHT là có sự tương đồng cao. Sử dụng kiểm định Mantel để xác định mối tương quan giữa các ma trận tương đồng di truyền phân tích bởi các chỉ thị cho thấy có sự tương quan cao giữa các ma trận tương đồng di truyền. Hệ số tương quan (r) giữa hai ma trận phân tích bởi RAPD và ISSR là 0,741 ($P < 0,0001$). Ma trận tương đồng di truyền phân tích bởi RAPD hay ISSR thể hiện mối tương quan rất cao với ma trận kết hợp giữa RAPD + ISSR, hệ số tương quan lần lượt là 0,934 và 0,932 ($P < 0,0001$). Kết quả này đã khẳng định sự tương quan cao giữa các ma trận khi phân tích bởi các chỉ thị (Bảng 6). Sự tương quan cao giữa các nhóm chỉ thị này cũng được mô tả trên đối tượng đậu đỗ (Zargar & cs., 2016).



Hình 2. Sơ đồ thể hiện mối quan hệ di truyền của 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo xây dựng bằng phương pháp UPGMA được phân tích bởi các chỉ thị phân tử (A) chỉ thị RAPD; (B) chỉ thị ISSR; (C) kết hợp chỉ thị RAPD và ISSR

Bảng 7. Kết quả phân tích tương quan giữa các ma trận hệ số tương đồng bằng kiểm định Mantel

Cặp ma trận so sánh	Hệ số tương quan (r)	P (two-tailed)	Alpha
RAPD vs. ISSR	0,741	< 0,0001	0,05
RAPD vs. kết hợp RAPD và ISSR	0,934	< 0,0001	0,05
ISSR vs. kết hợp RAPD và ISSR	0,932	< 0,0001	0,05



Hình 3. Phân tích thành phần chính (PCA analysis) của 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo dựa trên kết hợp giữa hai chỉ thị RAPD và ISSR

Để phản ánh tốt hơn mối quan hệ của 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo dựa trên ma trận tương đồng di truyền, phân tích PCA sử dụng mô hình kết hợp của chỉ thị RAPD + ISSR được tiến hành. Trong mô hình PCA, hai thành phần chính đóng góp 37,58% và 18,76% (tổng số 56,34%) (Hình 3). Theo Gower & cs. (2011) các biến nằm gần nhau (góc nhỏ) có mối tương quan thuận với nhau, các biến nằm khác phía (góc lớn) có mối tương quan nghịch đảo và các biến nằm cách nhau góc 90°C thì không có tương quan. Như vậy, sự phân nhóm bởi phân tích thành phần chính (PCA) thể hiện sự tương đồng khi so sánh với sơ đồ mối quan hệ di truyền các mẫu giống phân tích bởi phương pháp UPGMA (Hình 2). Các mẫu giống thu thập từ Hà Nội, Hưng Yên, Thái Nguyên, Đà Nẵng đều thuộc một nhóm di truyền trong khi thực tế đây là những địa phương có khoảng cách địa lý xa nhau. Lý giải cho điều này có thể do các mẫu giống đều là các mẫu nuôi cấy nhân tạo và được phân bố đi nhiều nơi. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi Sung & cs. (1999) và Wang & cs. (2008) khi phân tích các mẫu giống *C. militaris* bằng chỉ thị RAPD và ITS. Các nghiên cứu chỉ ra không có sự tương quan giữa đa dạng di truyền các mẫu giống *C. militaris* và nguồn gốc thu thập của chúng.

4. KẾT LUẬN

Phân tích trình tự ITS cho thấy 12 mẫu giống đông trùng hạ thảo thu thập được đều thuộc loài *Cordyceps militaris* và có rất ít sự biến động di truyền trong vùng trình tự này. Phân tích đa dạng di truyền của 12 mẫu giống bằng chỉ thị RAPD và ISSR chỉ ra có sự đa dạng cao về mặt di truyền, tuy nhiên sự đa dạng này không tương quan với nguồn gốc thu thập của chúng. Kết quả nghiên cứu hiện tại cung cấp thông tin hữu ích cho công tác bảo tồn, định hướng khai thác và phát triển nguồn gen đông trùng hạ thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314-31.
- Chen Y., Zhang Y.P., Yang Y. & Yang D. (1999). Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers. *Biochem Genet.* 37(5-6): 201-13.
- Chen Y.Q., Hu B., Xu F., Zhang W.M., Zhou H. & Qu L.H. (2004). Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China. *FEMS Microbiology Letters.* 230: 153-158.

- Gower J.C., Lubbe S.G. & Le Roux N.J. (2011). Understanding Biplots. John Wiley & Sons.
- Holliday J. & Cleaver M. (2008). Medicinal Value of the Caterpillar Fungi Species of the Genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) - A Review. *Int. J. Med. Mushrooms*. 10(3): 219-234.
- Holliday J.C, Cleaver P., Loomis-Powers M. & Patel D., (2004). Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*. 6: 151-164.
- Jędrejko K.J., Lazur J. & Muszyńska B. (2021). *Cordyceps militaris*: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity. *Foods*. 10(11): 2634.
- Lam K.Y., Chan G.K., Xin G.Z., Xu H., Ku C.F., Chen J.P., Yao P., Lin H.Q., Dong T.T. & Tsim K.W. (2015). Authentication of *Cordyceps sinensis* by DNA Analyses: Comparison of ITS Sequence Analysis and RAPD-Derived Molecular Markers. *Molecules*. 20(12): 22454-62.
- Li J., Gao G., Li B., Li B. & Lu Q. (2022). Genetic Analysis of *Prunus salicina* L. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Intersimple Sequence Repeat (ISSR). *Genet. Res. ID* 2409324.
- Li S.P., Yang F.Q. & Tsim K.W. (2006). Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J Pharm Biomed Anal*. 41(5): 1571-84.
- Liang H.H., Cheng Z., Yang X.L., Li S., Zhou T.S., Zhang W.J. & Chen J.K. (2005). Genetic variation and affinity of *Cordyceps sinensis* in Qinghai Province based on analysis of morphologic characters and inter-simple sequence repeat markers. *Chin Tradit Herb Drugs*. 36(12): 1859-1864.
- Patel D.M., Fougat R.S. & Sakure A.A. (2016). Detection of genetic variation in sandalwood using various DNA markers. *3 Biotech*. 6(1): 1-11.
- Prevost A. & Wilkinson M. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet*. 98: 107-112.
- Serrote C.M.L., Reiniger L.R.S., Silva K.B., Rabaiolli S.M.D.S. & Stefanel C.M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*. 5: 726: 144175.
- Singh R., Negi P.S. & Ahmed Z. (2009). Genetic variability assessment in medicinal caterpillar fungi *cordyceps* spp. (ascomycetes) in central himalayas. *Int. J. Med. Mushrooms*. 11(2): 185-189.
- Sokal R.R. & Michener C.D. (1958). A statistical methods for evaluating relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 38: 1409-1448.
- Sung J.M., Kim S.H., Yoon C.S., Sung G.H. & Kim Y.W. (1999). Analysis of genetic relationship of *Cordyceps militaris* in Korea by Random Amplified Polymorphic DNA. *The Korean Journal of Mycology* 27: 256-273 (In Korean).
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B. & Spatafora J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol*. 57: 5-59.
- Tran M.H., Nguyen T.M. & Huynh V.B. (2023). Diversity evaluation of *Cordyceps* spp. in Bidoup Nui Ba, Lam Dong province, Vietnam. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*. 1155: 012003.
- Trần Thanh Thy & Lê Văn Vàng (2020). Nghiên cứu môi trường thích hợp nhân nuôi nấm *Cordyceps militaris* trên vật chủ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 56(5B): 125-134.
- Trịnh Tam Kiệt & Trịnh Tam Bảo (2008). Thành phần loài nấm dược liệu của Việt Nam. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng - Chuyên san Công nghệ Sinh học*. 4: 39-42.
- Wang L., Zhang W.M., Hu B., Chen Y.Q. & Qu L.H. (2008). Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Diversity*. 31: 147-155.
- Wu D.T., Lv G.P., Zheng J., Li Q., Ma S.C., Li A.P. & Zhao J. (2016). *Cordyceps* collected from Bhutan, an appropriate alternative of *Cordyceps sinensis*. *Sci. Rep*. 6: 37668.
- Zargar S.M, Farhat S., Mahajan R., Bhakhri A. & Sharma A. (2016). Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean. *Saudi J Biol Sci*. 23(1): 139-149.
- Zhang Y., Xu L., Zhang S., Liu X., An Z., Wang M. & Guo Y., (2009). Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: Implications for its evolution and conservation. *BMC Evol. Biol*. 9: 290.